

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E  
GENÉTICA - BEG

Carine Bropp Cardoso

**EFEITO DA RESTRIÇÃO DE GLICOSE ASSOCIADA AO  
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO SOBRE A VIABILIDADE  
CELULAR DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO *IN*  
*VITRO***

Florianópolis

17 de Abril de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E  
GENÉTICA - BEG

Carine Bropp Cardoso

**EFEITO DA RESTRIÇÃO DE GLICOSE ASSOCIADA AO  
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO SOBRE A VIABILIDADE  
CELULAR DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO *IN*  
*VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao departamento de  
Biologia Celular, Embriologia e  
Genética, do Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina, como requisito para  
obtenção do título de bacharel em  
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Beatriz  
Nedel Mendes de Aguiar

Co-orientador: Biólogo Lucas Felipe  
Fernandes Bittencourt

Florianópolis

17 de Abril de 2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Cardoso, Carine Bropp

Efeito da restrição de glicose associada ao tratamento quimioterápico  
sobre a viabilidade celular de glioblastoma multiforme humano *in*  
*vitro*

Carine Bropp Cardoso ; orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Beatriz Nedel  
Mendes de Aguiar ; co-orientadora, Biólogo Lucas Felipe Fernandes  
Bittencourt. - Florianópolis, SC, 2013.

45 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal  
de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em  
Ciências Biológicas.

Inclui referências


1. Ciências Biológicas. 2. glioblastoma multiforme. 3. quimioterapia.  
4. restrição de glicose. 5. metabolismo  
energético.
- I. Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, Cláudia. II. Felipe Fernandes  
Bittencourt, Lucas . III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

**Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado para  
obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas”, e aprovado  
em sua forma final pela banca examinadora.**

Florianópolis, 6 de abril de 2013.

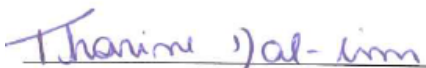
**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Risoleta  
Freire Marques  
Coordenadora do Curso de  
Ciências Biológicas

  
\_\_\_\_\_  
PRESIDENTE DA BANCA  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Beatriz Nedel Mendes de  
Aguiar,  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
MEMBRO TITULAR

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Carla Inês Tasca,  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
MEMBRO TITULAR

Dr.<sup>a</sup> Tharine A. Dal-Cim,  
Universidade Federal de Santa Catarina



## **Agradecimentos**

Antes de qualquer coisa, preciso dizer que os agradecimentos deste trabalho são tão importantes quanto o trabalho em si. Muitas pessoas estiveram presentes, mesmo que indiretamente, para que todos os processos acontecessem. Lembro daquele momento em que meu co-orientador Lucas praticamente me empurrou pra dentro da sala da Profa. Cláudia, e fui recebida da melhor maneira possível, por alguém que já gostou da minha pessoa assim, de graça. E a partir dali tudo foi se encaixando. Prazos foram adiados, projetos modificados, mas por fim esse trabalho surgiu. Agradeço de coração ao Lucas e Profa. Cláudia pela confiança e por acreditarem em mim, no momento que nem eu sabia que conseguiria iniciar o terceiro projeto de TCC. Vocês estão no meu coração, obrigada por tudo! Agradeço também à Profa. Dr.<sup>a</sup> Carla Tasca, M.Sc Karen e Dr.<sup>a</sup> Tharine, que compartilharam seu espaço para os procedimentos experimentais, e sempre se mostraram prestativas e atenciosas às minhas ingenuidades perante às técnicas novas que aprendi. Espero que possamos trabalhar todos juntos, cumprir nossos objetivos como pesquisadores, contribuindo para a ciência e, principalmente, trazendo benefícios para a sociedade, que é nosso principal papel como estudantes e pesquisadores. No mais, agradeço à minha família, Alda, Crystiane, Camille e Cláudia, que sempre me incentivaram para que eu continuasse e insistisse; o apoio de vocês foi e é essencial. Aos amigos queridos, Andressa, Bruna, Camila, Gabriela, Luciana e Nathália, que muitas vezes escutaram minhas lamentações, passando boas energias positivas, e me cobrando para que eu terminasse minhas funções. Dedico este trabalho a vocês, e os méritos e comemorações, vamos aproveitar juntos. Rumo a uma nova fase, que seja proveitosa e excelente. Obrigada amigos e família!





## Resumo

Gliomas astrocíticos são os tumores do sistema nervoso central mais comuns, e abrangem aproximadamente dois terços de todos os tumores de origem glial. O Glioblastoma Multiforme (GBM) é considerado o mais maligno entre os tipos de tumores do sistema nervoso central, e tem como características histológicas a presença de células pleomórficas, com alta atividade mitótica, sendo tumores heterogêneos em sua composição celular, nos quais encontram-se células tronco tumorais, células mesenquimais e células do estroma. A intervenção cirúrgica é indicada em quase todos os casos de tratamentos de gliomas, normalmente precedida por radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia consiste no uso de substâncias citotóxicas no tratamento de cânceres, com aplicação geralmente de forma sistêmica. Os quimioterápicos cisplatina, carmustina e temozolomida fazem parte de uma classe de fármacos citotóxicos que agem como alquilantes de DNA, formado adutos inter e intra-cadeia que impedem a replicação do material genético nas células e, conseqüentemente, levando-as à apoptose, sendo altamente tóxicos para células em proliferação. A glicose é um substrato energético obrigatório para manter as funções cerebrais, sendo que os corpos cetônicos podem ser metabolizados alternativamente para produção de energia, quando os níveis de glicose se tornam limitados, o que ocorre durante terapias metabólicas de restrição de glicose. O objetivo deste trabalho foi analisar a viabilidade celular em culturas de um glioblastoma multiforme (GBM1), obtidas a partir de ressecção cirúrgica, quando expostas ao meio de baixa concentração de glicose, observando também a interferência da exposição destas células aos quimioterápicos cisplatina, carmustina e temozolomida. Os resultados demonstraram que os quimioterápicos possuem níveis de citotoxicidade diferentes para as células GBM1, e a restrição de glicose teve influência na diminuição da viabilidade celular de maneira independente à ação dos quimioterápicos. O entendimento das diferenças biológicas entre células normais e células cancerosas é essencial para o desenvolvimento de drogas anticancerígenas mais eficientes e menos tóxicas, além de tratamentos alternativos de baixa toxicidade viáveis para uso concomitante no combate aos tumores cerebrais.

**Palavras-chave:** glioma, quimioterapia, glioblastoma multiforme, cisplatina, temozolomida, carmustina, restrição de glicose, metabolismo energético.



## **Lista de abreviaturas de siglas**

ADP - Adenosina 5' Difosfato

ATP - Adenosina 5' Trifosfato

BCNU - Carmustina

CIS - Cisplatina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNAm - DNA mitocondrial

DMEM - Meio de Cultura Modificado Dulbecco's

DMSO - Dimetilsulfóxido

GABA - Ácido Gama Aminobutírico

GBM - Glioblastoma Multiforme

GLI - Glicose

GR - Glutathione Redutase

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio

OMS - Organização Mundial da Saúde

RE - Retículo Endoplasmático

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SNC - Sistema Nervoso Central

SBF - Soro Bovino Fetal

TMZ - Temozolomida

## **LISTA DE FIGURAS**

### **Introdução**

Figura 1 Alquilação do DNA pelas moléculas de cisplatina.....20

Figura 2 Alquilação do DNA pelas moléculas de temozolomida e carmustina.....21

### **Resultados**

Figura 3 Viabilidade celular pela ação de CIS (curva de concentração).....30

Figura 4 Viabilidade celular pela ação de BCNU (curva de concentração).....30

Figura 5 Viabilidade celular pela ação de TMZ (curva de concentração).....31

Figura 6 Viabilidade celular pela ação de CIS e restrição de glicose.....32

Figura 7 Viabilidade celular pela ação de BCNU e restrição de glicose.....35

Figura 8 Viabilidade celular pela ação de TMZ e restrição de glicose.....35

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
1.2.Tumores do SNC e glioblastomas.....	15
1.3.Tratamentos e quimioterapia.....	16
1.4 Carmustina, Cisplatina e Temozolomida.....	18
1.5. Restrição de glicose.....	22
2.OBJETIVOS.....	25
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Obtenção do tumor.....	25
3.2. Cultura de células.....	25
3.3. Tratamentos com quimioterápicos.....	25
3.4. Tratamentos com meios de diferentes concentrações de glicose.....	25
3.5. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT).....	27
3.6. Análise estatística.....	27
4.RESULTADOS.....	29
4.1 Viabilidade celular do glioblastoma após tratamento com CIS, BCNU e TMZ.....	29
4.2 Viabilidade celular do glioblastoma após tratamento com CIS, BCNU e TMZ em meio de cultura com restrição de glicose.....	29
5.DISSCUSSÃO.....	35
6.CONCLUSÕES.....	39
7.ANEXO – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.....	41
8.REFERÊNCIAS.....	43









## **1 – INTRODUÇÃO**

### **1.1 - Tumores do SNC e glioblastomas**

O Sistema Nervoso Central (SNC) em humanos apresenta uma variedade de células determinadas e de alta especificidade em suas funções celulares. Pode-se dividir as células do SNC em dois conjuntos: a macróglia, que compreende os astrócitos e os oligodendrócitos, e a micróglia, constituída pelos microgliócitos, além das células neuronais, cuja função principal é a despolarização de sua membrana para propagação de um estímulo nervoso, e as células ependimárias, que constituem o epitélio de revestimento cerebral. Entre as funções principais dos tipos celulares do SNC, os astrócitos tem função de isolamento e sustentação, são o principal sítio de armazenamento de glicogênio no cérebro e controlam os níveis de potássio extraneuronal, além de outras funções importantes. Os oligodendrócitos se distribuem entre os neurônios, e formam a bainha de mielina que isola o potencial de ação que se propaga pelo axônio neuronal. Os microgliócitos são pequenas células de origem mesodérmica (as outras células do SNC tem origem epidérmica), e possuem função fagocítica, semelhante aos macrófagos do sistema imune (MACHADO, 2002).

Gliomas astrocíticos ou astrocitomas são os tumores do SNC mais comuns e abrangem aproximadamente dois terços de todos os tumores de origem glial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece sete tipos distintos de astrocitomas: tumores astrocíticos, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico, astrocitoma pilocítico, xantastrocitoma pleomórfico, astrocitoma subependimal de células gigantes e o glioblastoma multiforme. Os tumores cerebrais primários, como os glioblastomas multiformes, são um conjunto de neoplasias malignas originárias de células de sustentação da glia. São tumores raros, correspondendo a 2% dos todos os cânceres conhecidos, porém com elevada mortalidade em adultos. Já os gliomas secundários são derivados de metástases, provenientes de astrocitomas, oligodendromas e/ou ependimomas, no caso dos tumores do SNC, considerados multiformes por derivarem de diferentes tipos celulares. (REIFENBERGER et al., 2010).

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é considerado o mais maligno entre os tipos de tumores do sistema nervoso central. O prognóstico é ruim na maioria das vezes, sendo que somente cerca de 12% dos pacientes sobrevivem por mais de 36 meses. Os glioblastomas

primários geralmente se desenvolvem em pacientes considerados jovens, com menos de 45 anos. Os glioblastomas secundários se desenvolvem *de novo*, sem que haja um histórico de lesões anteriores, e ocorrem na maioria dos casos, sendo mais comuns em pacientes na faixa etária entre 55 a 60 anos. As células tumorais nos glioblastomas são pleomórficas, com alta atividade mitótica com presença de mitose atípica; são tumores heterogêneos em sua composição celular, onde se encontram células tronco tumorais, células mesenquimais e células do estroma. Além das células neoplásicas, também estão presentes monócitos e macrófagos, que contribuem diretamente para a progressão tumoral pela liberação de fatores pró-inflamatórios e angiogênicos. Muitos tumores acabam por invadir o parênquima neural, e as células tumorais se espalham, tornando a localização do tumor imprecisa, dificultando a ressecção cirúrgica e tornando impossível a total remoção das células neoplásicas (SEYFRIED et al. 2012).

A Tabela 1 mostra a graduação padronizada pela OMS para os tumores astrocíticos. Segundo a classificação da OMS, a gravidade das neoplasias do SNC é graduada de I a IV, os glioblastomas são considerados de nível IV, caracterizando tumores sólidos altamente invasivos. Os glioblastomas podem ser derivados de um astrocitoma difuso (nível II) e/ou de um astrocitoma anaplásico (nível III), por progressão maligna das células neoplásicas. Histopatologicamente, o que difere os glioblastomas dos tumores de menor grau é a presença de proliferação microvascular e necrose. O prognóstico no caso dos glioblastomas é escasso, tanto para primários quanto para secundários, e os dados histológicos não são suficientes para diferir a origem de cada tipo (DEIMLING et al., 2009).

## **1.2 - Tratamentos e quimioterapia**

A intervenção cirúrgica é indicada em quase todos os casos de tratamentos de gliomas em algum ponto, durante o curso da doença, normalmente precedida por radioterapia e quimioterapia. A cirurgia é importante para obtenção de diagnóstico histológico, além de reduzir drasticamente os sintomas da doença e diminuir a área ocupada pelo tumor. A ressecção é um tratamento imediato em termos de melhoria dos sintomas, mas a retirada de um tumor cerebral implica em sequelas na maioria dos casos. Apesar da diminuição do tumor realmente ocorrer, os tratamentos, na maioria das vezes, não resultam na cura da doença, pois dificilmente conseguem eliminar todas as células cancerosas, e as

chances de ocorrerem recidivas são altas. Além dos tratamentos normais não serem 100% eficazes, a saúde geral do paciente fica debilitada de forma crítica, e muitas vezes o organismo não suporta os efeitos colaterais dos tratamentos comuns, que são considerados extremamente invasivos. O progresso do tratamento de gliomas visando a cura total depende da implementação de terapias adjuvantes às conhecidas, e novas estratégias terapêuticas estão sendo estudadas, com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais das terapias comuns (OTTO, 2002).

**Tabela 1. Graduação dos tumores do sistema nervoso central e suas características segundo a OMS. Adaptado de KLEIHUES e colaboradores (2002).**

	<b>Características histopatológicas</b>	<b>Tipos de tumores</b>
<b>Grau I</b>	Lesões não infiltrativas, com baixo potencial proliferativo, sem atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose	Astrocitoma pilocítico, astrocitoma de células gigantes subependimais, xantastrocitoma pleomórfico e subependimoma
<b>Grau II</b>	Lesões em geral infiltrativas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose	Astrocitoma difuso, oligodendroglioma, ependimoma e oligoastrocitoma misto
<b>Grau III</b>	Lesões infiltrativas, com atipias nucleares e alto índice mitótico	Astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, ependimoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico
<b>Grau IV</b>	Lesões infiltrativas, atipias nucleares, alto índice mitótico, células gigantes multinucleadas, necrose e proliferação endotelial	Glioblastoma multiforme

A quimioterapia consiste no uso de substâncias citotóxicas no tratamento de cânceres, com aplicação geralmente de forma sistêmica. Os quimioterápicos podem possuir mecanismos de ação diferentes,

dependendo do seu objetivo de aplicação, podendo ser usados em conjunto com outros tratamentos e/ou administradas antes da remoção cirúrgica para diminuição do tumor. Estas drogas são mais ativas em células que se dividem com frequência, sendo ineficazes quando a célula se encontra na fase G0 do ciclo celular (fase de repouso). As células tumorais são mais sensíveis aos quimioterápicos por estarem em constante divisão, porém, células normais que se dividem constantemente, como as do tecido gastrointestinal, folicular, gonadal e hematopoiético também sofrem pelos efeitos citotóxicos (DEIMLING et al., 2009).

Durante aproximadamente 50 anos de pesquisas, não houve maiores avanços sobre o tratamento de glioblastomas, sendo que a descoberta e aplicação da Temozolomida foi de grande importância no tratamento quimioterápico, proporcionando um considerável aumento da sobrevida. Entretanto, o tratamento considerado ideal ainda não foi determinado, principalmente pela especificidade de cada caso. Muitos estudos estão sendo feitos em busca de terapias consideradas alternativas, com o objetivo de diminuir os danos causados à saúde dos pacientes. Entre estas alternativas, estão as terapias moleculares, que visam encontrar um alvo para ação terapêutica, diretamente no tumor, e também as terapias metabólicas, que consistem na mudança dos hábitos alimentares e hormonais do organismo, a fim de debilitar as células tumorais e aumentar a eficiência dos quimioterápicos (SEYFRIED et al. 2012).

### **1.3 – Cisplatina, Carmustina e Temozolomida**

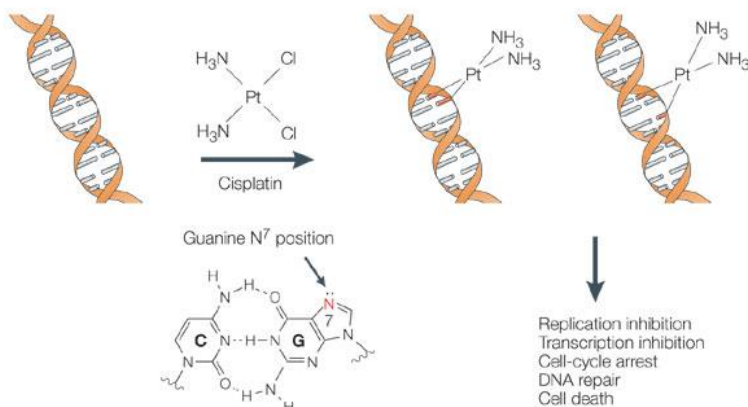
Cisplatina, Carmustina e Temozolomida fazem parte de uma classe de fármacos citotóxicos que agem como alquilantes de DNA, formando adutos inter e intra-cadeia, impedindo a replicação do material genético nas células e consequentemente levando-as à apoptose. São considerados agentes alquilantes do DNA as substâncias altamente tóxicas para células em proliferação, pela modificação covalente das moléculas nucleofílicas das células. Entre os subtipos de alquilantes, estão as nitrosouréias, que modificam o DNA preferencialmente no oxigênio na posição 6 da base nitrogenada guanina, representados pela temozolomida e a carmustina. A cisplatina é um composto de platina que faz ligações covalentes com o nitrogênio 7 das bases guanina e adenina. Muitas células somáticas não estão em divisão a todo o momento sob circunstâncias normais, portanto o uso da cisplatina em

baixas concentrações possui efeito antitumoral. Quando o dano celular causado pelo quimioterápico se sobrepõe a capacidade de reparação da célula, a apoptose é ativada (GERSON, 2002).

A Cisplatina (cis-diamino dicloro platina) ou simplesmente CIS, é uma droga quimioterápica utilizada em grande variedade de tumores sólidos. Baixas concentrações de CIS são suficientes para conter o ciclo celular e induzir a morte por apoptose ou necrose, enquanto altas concentrações produzem efeito necrótico. A necrose é uma maneira de morte celular que induz resposta inflamatória no tecido e estimula o sistema imune inato. Os lisossomos são organelas celulares importantes para conexão do compartimento extracelular com o citosol e outras organelas internas, incluindo o núcleo celular. Tem papel significativo na citotoxicidade da cisplatina, pela relação destes com o tráfego de endossomos. As alterações lisossomais e injúria dessas organelas mostra que este pode ser um caminho para desencadear morte celular. O aumento da permeabilidade da membrana dos lisossomal causa liberação do seu conteúdo no citosol, causando proteólise massiva e, conseqüentemente, a necrose, ou sinalizando e ativando processos apoptóticos (CARRILLO et al., 2012). A Figura 1 mostra o processo de alquilação do DNA pelas moléculas de cisplatina.

Tradicionalmente, o dano ao DNA é considerado o principal mecanismo da citotoxicidade da cisplatina, apesar de somente 1% da quantidade total de cisplatina acumulada nas células é limitado a ação no DNA (WANG et al., 2005). A cisplatina foi sempre reconhecida por se acumular no núcleo celular, principalmente no nucléolo (ligado ao DNA e histonas), e no espaço entre as duas membranas da carioteca (membrana dupla nuclear). As moléculas de cisplatina entram isoladamente no núcleo, onde se ligam ao DNA para a formação de adutos. A formação dos adutos cisplatina-DNA faz a disrupção da estrutura de dupla fita e interfere na replicação do DNA e na transcrição de genes. Esse dano ao DNA faz com que o ciclo celular estacione e ative a maquinaria de reparação do genoma. A cisplatina interage diretamente com a mitocôndria, causando alterações nestas organelas, e ativando o caminho apoptótico, por diminuir a respiração celular e aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), caracterizando as mitocôndrias disfuncionais. Teoricamente, o efeito direto da cisplatina nas mitocôndrias é suficiente para desencadear apoptose (WANG et al., 2005). O excesso de ROS causa estresse

oxidativo mitocondrial e celular, danifica várias macromoléculas, incluindo o DNA, proteínas e lipídeos. O Retículo Endoplasmático (RE) tem papel principal na biossíntese celular, como no dobramento apropriado e na maturação de proteínas. O RE também tem a função de dirigir essas proteínas para os seus locais de secreção. Alterações ou disfunções do RE produz acúmulo de proteínas não processadas, desdobradas e disfuncionais, além de desregular a estocagem de cálcio, causando o estresse do RE. Esta situação desencadeia a resposta às proteínas desdobradas (UPR), que é capaz de ativar a apoptose. Os mecanismos pelos quais a cisplatina pode interferir no RE são diretos, pela ligação a proteínas e enzimas que atuam nas funções reticulares, ou indiretamente, pela ação nas organelas que se relacionam intimamente aos processos do retículo endoplasmático (SANCHO-MARTÍNEZ et al., 2012).

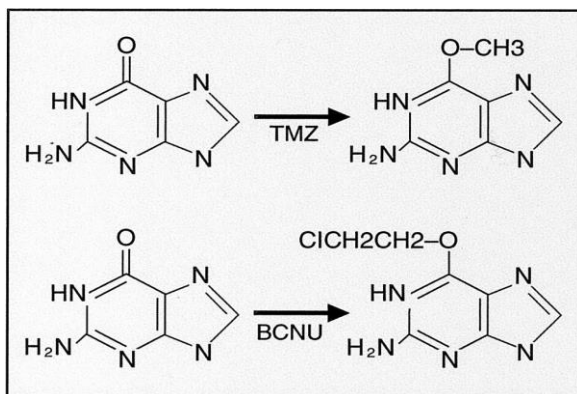


Nature Reviews | Drug Discovery

**Figura 1. Mecanismos de alquilação do DNA pelas moléculas de cisplatina. Fonte: Wang e colaboradores, 2005.**

A Carmustina (1,3-bis(2-cloro etil)-1-nitrosourea ou BCNU) é um dos agentes quimioterápicos alquilantes utilizados no tratamento de tumores cerebrais, mielomas e linfomas, e potencialmente atravessa a barreira hematoencefálica. Foi postulado que os efeitos citotóxicos da carmustina ocorrem devido a sua capacidade de interligação com o DNA. Este quimioterápico também é conhecido por inibir a atividade da enzima Glutathione Redutase (GR), em células normais e tumorais. GR é

uma enzima crítica para manter a homeostase intracelular pela manutenção da concentração da glutathiona citosólica. A glutathiona é uma importante enzima antioxidante. A inibição da atividade de GR reduz os níveis de glutathiona, o que pode levar ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células. É possível afirmar que a diminuição da atividade da enzima GR pode ser responsável pela citotoxicidade da carmustina, pela indução do estresse oxidativo, ativando cascatas proteolíticas que desencadeiam apoptose celular (MI AN et al., 2011).



**Figura 2 . Alquilação do DNA por TMZ e BCNU, impedindo a abertura da dupla-fita de DNA. Fonte: GERSON, 2002.**

A Temozolomida é um agente alquilante de boa absorção capaz de penetrar a barreira hematoencefálica utilizado no tratamento de tumores sólidos, em especial para tumores cerebrais. Após sua absorção, o TMZ é metabolizado no alquilante eletrofílico metildiazônio, capaz de transferir seu grupo metil o DNA. O aduto DNA-metil é o principal responsável pela citotoxicidade deste quimioterápico. O local preferencialmente alquilado é o oxigênio na posição 6 da guanina, assim como ocorre na carmustina. Além da intervenção direta ao DNA, o TMZ tem efeito mitocondrial, afetando a despolarização de membrana destas organelas, desencadeando autofagia, que pode provocar apoptose celular. Assim como a cisplatina, este quimioterápico influencia em vários processos celulares, causando estresse no RE, interferindo no dobramento de proteínas sintetizadas e desencadeando processos apoptóticos (LIN et al., 2012). A eficácia de uma droga quimioterápica depende não somente da sua habilidade de induzir danos ao DNA, mas também da habilidade celular para detectar e responder a esse dano. A

procura pelo quimioterápico mais eficiente entre essas classes de drogas é limitada pelo entendimento insuficiente que se tem dos mecanismos de ação destes fármacos (PAPAIT et al., 2009). Ainda, a busca de tratamentos adjuvantes ao quimioterápico é de extrema importância, sendo a restrição de glicose, como segue, um destes tratamentos.

#### **1.4 - Restrição de glicose**

A glicose é um substrato energético obrigatório para manter as funções cerebrais. O cérebro humano constitui somente 2% de todo o corpo, sendo que para manter seu funcionamento ideal, necessita de aproximadamente 25% da glicose total utilizada pelo corpo. É previsto que o cérebro utilize cerca de 26,6 mols de glicose por 100 g de tecido, por minuto. Essa quantidade de glicose não somente servirá como fonte energética, como pode ser incorporada pelos astrócitos na forma de glicogênio, constituinte essencial para macromoléculas como glicolípídeos e glicoproteínas, presentes nas células neurais. A glicose também participa no processo de síntese de três neurotransmissores cerebrais; o glutamato, o ácido gama aminobutírico (GABA) e a acetilcolina (MAGISTRETTI, 2004).

Enquanto a glicose é o único combustível metabólico utilizado em quase todas as funções cerebrais sob condições fisiológicas normais, o cérebro pode metabolizar corpos cetônicos para produção de energia quando os níveis de glicose se tornam limitados, o que ocorre durante terapias metabólicas de restrição de glicose (SEYFRIED et al., 2011). Esse caso representa circunstâncias particulares, em que outros substratos, que não a glicose, podem ser utilizados pelas células cerebrais. Por exemplo, neonatos, durante a fase de amamentação, têm a capacidade de usar corpos cetônicos como o acetoacetato e o D-3-hidroxibutirato como fontes energéticas, em adição ao uso da glicose. Essa capacidade é um exemplo interessante de um mecanismo adaptativo desenvolvido, pois o leite materno é altamente rico em lipídeos (HEIDEN et al., 2009).

O metabolismo da glicose no tecido cerebral é semelhante ao que ocorre em outros tecidos do organismo, e compreendem os três passos comuns do processo de obtenção de ATP (Adenosina Trifosfato). A primeira fase é a glicólise, momento em que ocorre a quebra da molécula de glicose de duas moléculas de piruvato, preparando a glicose para o próximo passo, o ciclo do ácido carboxílico. Durante o ciclo do ácido carboxílico, a molécula de piruvato sofre modificações derivadas



de reações de descarboxilação, fosforilação, hidratação, desidratação e condensação, catalisadas por inúmeras proteínas do ciclo, com o objetivo de acumular íons  $H^+$  que serão utilizados no último processo da produção de ATP. A fosforilação oxidativa, último processo da glicólise aeróbica, ocorre nas mitocôndrias celulares, onde os íons  $H^+$  acumulados durante o ciclo de Krebs são descarregados para sua função, que é a produção de energia potencial química e elétrica. Esta energia é suficiente para induzir a fosforilação da Adenosina 5' Difosfato (ADP) pela enzima ATP sintase, produzindo grandes quantidades de moléculas de Adenosina 5' Trifosfato – cerca de 38 ATPs por molécula de glicose clivada. A ATP sintase é uma proteína transmembrana presente na membrana interna mitocondrial, e funciona como um canal por onde transitam os íons  $H^+$  (LEHNINGER et al., 1995). Em condições de anóxia, a glicólise ocorre através de outras reações, em que o piruvato é convertido em lactato, por exemplo, no caso de quando o consumo de oxigênio não acompanha a utilização de glicose, e a taxa de produção de piruvato pela glicólise se torna maior do que a oxidação deste pelo ciclo de Krebs. Esta é uma condição normalmente observada nas fibras musculares durante exercício intenso, conhecida como glicólise anaeróbica.

Quando ocorre incompatibilidade entre a utilização da glicose e o consumo de oxigênio, o lactato é produzido. Essa transição na utilização da glicose e o aumento na produção de lactato parece ocorrer no cérebro humano durante sua ativação, por exemplo, na estimulação fisiológica sensorial (DIAZ-RUIZ et al., 2009). SAFDIE e colaboradores (2012), demonstraram que jejum de curto prazo (48 horas) aumentou a eficácia de temozolomida e de radioterapia em gliomas implantados em camundongos C57B6, indicando que a restrição de glicose pode ter um efeito evidente no tratamento desta doença. Assim, o estudo da combinação de tratamento quimioterápico/restrrição de glicose em células de gliomas humanos, provenientes de ressecção tumoral, é de extrema importância para o entendimento da fisiologia humana e descoberta de novas técnicas que possam aumentar a sobrevida de pacientes acometidos por essa doença.

Devido ao elevado grau de heterogeneidade celular do cérebro, o entendimento do papel relativo destes tipos celulares no fluxo de substratos energéticos depende da análise de ensaios preparados como as culturas primárias ricas em astrócitos, neurônios e células endoteliais vasculares. Esses preparados não necessariamente expressam todas as propriedades das células *in situ*, mas estudos *in vitro* são úteis na

identificação das características das culturas de células tumorais e seus processos metabólicos, e possibilitando correlação entre os parâmetros do metabolismo energético cerebral que são monitorados no organismo propriamente dito.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo geral:**

O objetivo principal deste trabalho foi analisar a viabilidade celular em culturas de um glioblastoma multiforme (GBM1) proveniente de um paciente submetido à cirurgia de ressecção de tumor no Hospital Celso Ramos, quando expostas ao meio de baixa glicose, observando também a interferência da exposição destas células aos quimioterápicos cisplatina, carmustina e temozolomida.

### **2.2 - Objetivos específicos:**

- Analisar a viabilidade celular em culturas de células GBM1 perante o uso de diferentes concentrações com os quimioterápicos (cisplatina, carmustina e temozolomida);
- Comparar a viabilidade celular nas culturas expostas ao meio de baixa concentração de glicose, em comparação ao meio com concentração de glicose usual;
- Comparar a viabilidade celular nas culturas tratadas com quimioterápico nas concentrações de 300 e 350  $\mu\text{M}$ , mantidas em meio de baixa concentração de glicose e glicose em concentração usual.

## **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 – Obtenção do tumor**

A cultura primária de glioblastoma multiforme utilizada nos experimentos deste trabalho é derivada de um fragmento de tumor obtido pela equipe de neurocirurgia da médica residente Melina Moré, no Hospital Governador Celso Ramos, proveniente de uma cirurgia de ressecção de glioblastoma de uma mulher de 55 anos. O tumor estava localizado no corpo caloso e estendido para o ventrículo lateral esquerdo, sendo diagnosticado por histopatologia como um glioblastoma multiforme grau IV. Neste trabalho foram utilizadas culturas secundárias de diferentes (passagem 10 a 12), derivadas do tumor original, ao qual denominamos GBM1. A utilização das células

GBM1 em pesquisas foi devidamente avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPH) e autorizada para esse fim (vide ANEXO).

### **3.2 – Cultura de células**

As culturas celulares foram mantidas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, em meio DMEM F12(Gibco), com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco) e em estufa úmida a 37<sup>0</sup>C e 5% de CO<sup>2</sup>. Após a confluência das culturas, as células foram tripsinizadas e transferidas para placas de cultura de 96 poços (10<sup>4</sup> células/poço) por mais 2 a 3 dias, quando foram realizados os tratamentos com os diferentes quimioterápicos e meios, em condições de cultura.

### **3.3 - Tratamento com quimioterápicos**

Os quimioterápicos utilizados foram a Cisplatina (C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Pt – CIS), Carmustina (C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>C<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> - BNCU) e Temozolmida (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> – TMZ), (todos Sigma Aldrich). De acordo com as instruções do fabricante, a BNCU foi diluída em álcool etílico (99,5%, Synth); a TMZ em DMSO (99,9%, Vetec), sendo as duas drogas aliquotadas na concentração de 20 mM. Por sua vez, a CIS foi diluída em água tridestilada autoclavada e aliquotada na concentração de 2 mM. As alíquotas foram diluídas em DMEM F12 para o tratamento das culturas, em todos os experimentos.

A curva de concentração de cada droga teve a finalidade de estabelecer as concentrações ideais para os experimentos seguintes. Após a confluência as células foram lavadas com solução salina-fosfato (PBS) e tratadas com concentrações crescentes de cada fármaco (300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 e 700 μM). Os controles foram mantidos em DMEM F12, desprovido de SBF. Após 24 horas, foram realizados os testes de viabilidade celular.

### **3.4 - Tratamentos com meios de cultura em diferentes concentrações de glicose**

Após análise dos resultados das curvas, foram determinadas as concentrações de 300 e 350 μM para os tratamentos com meios de diferentes concentrações de glicose, para todos os quimioterápicos.

Estudos anteriores mostraram que células tumorais submetidas à restrição de glicose (meio de baixa glicose, 0,5 g/L) são mais susceptíveis ao tratamento com TMZ, em comparação com a mesma linhagem de células mantidas em meio de cultura com concentrações normais de glicose - 2 g/L (SAFDIE et al., 2012). Os meios utilizados e suas respectivas concentrações de glicose foram os seguintes: DMEM Low Glucose, 5,56 mM; DMEM F12, 17,51 mM e DMEM Low Glucose com acréscimo de glicose, 25 mM. Inicialmente as células foram cultivadas em DMEMF12, até crescerem (cerca de 2 dias), e após o meio de cultura foi trocado por solução específica - DMEM Low Glucose, com ou sem acréscimo de glicose. As culturas foram encubadas por 48 horas com os meios diferenciados, previamente aos tratamentos com quimioterápicos. O tempo de tratamento foi de 24 horas, e então as células foram submetidas ao teste de viabilidade. Os meios dos controles foram trocados por DMEMF12 após as 48 horas com meios diferenciados. Foram realizados três experimentos independentes para cada quimioterápico, totalizando n=3.

### **3.5 - Ensaio de viabilidade celular por MTT**

A avaliação do potencial citotóxico de CIS, BCNU e TMZ e sua capacidade em alterar a viabilidade em células de GBM1 em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose, foi realizada através do ensaio de MTT. O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases celulares (JACOBSSON E FOWLER, 1999). Após 24 horas de tratamento com os quimioterápicos, o meio de cultura foi removido e substituído por uma solução de 0,2 mg/ml de MTT em PBS por 2 horas a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, o MTT foi removido e os cristais de formazam reduzido foram solubilizados pela adição de dimetil-sufóxido (DMSO). A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância, medida em leitor de Elisa a 550nm.

### **3.6 - Análise estatística**

A análise estatística foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls. Os dados foram expressos como a média e desvio padrão, utilizando-se o

*software GraphPad Prism 4.0.* Foram considerados significantivos valores com  $p < 0,05$ .

## **4 - RESULTADOS**

### **4.1 - Viabilidade celular do glioblastoma após tratamento com CIS, BCNU e TMZ**

Com o propósito de determinar a viabilidade das células de glioblastoma após o tratamento com diferentes concentrações dos quimioterápicos CIS, BCNU e TMZ, foi realizado o ensaio de MTT. As culturas foram mantidas sob ação dos quimioterápicos com suas devidas concentrações por 24 horas. Após este período foi realizado o ensaio de MTT, o qual é determinado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Na Figura 3, é possível observar que CIS, nas concentrações de 300, 350 e 400  $\mu\text{M}$ , não foi capaz de alterar significativamente a viabilidade das células de glioblastoma. Entretanto, a partir de 450 até 700  $\mu\text{M}$ , a viabilidade celular foi reduzida de maneira estatisticamente significativa e de modo dose-dependente. A mesma curva de concentração foi realizada com o quimioterápico BCNU, porém com redução significativa da viabilidade celular já com a concentração de 400  $\mu\text{M}$ , conforme pode ser observado na Figura 4. Ainda, a partir da concentração de 450 mM de BCNU, pode-se observar uma redução drástica na viabilidade celular.

Na Figura 5, são demonstrados os resultados de viabilidade celular obtidos após o tratamento com TMZ (300 a 700  $\mu\text{M}$ ). Esta droga demonstrou diminuição na viabilidade celular já na concentração de 300  $\mu\text{M}$ , porém sem alterações significativas entre as diferentes concentrações, mesmo em 700  $\mu\text{M}$ . Estes resultados sugerem que a BCNU foi a droga mais eficaz, em se tratando apenas da viabilidade celular, para o tratamento desta linhagem celular, possivelmente pelo diferente modo de ação de cada uma destas drogas.

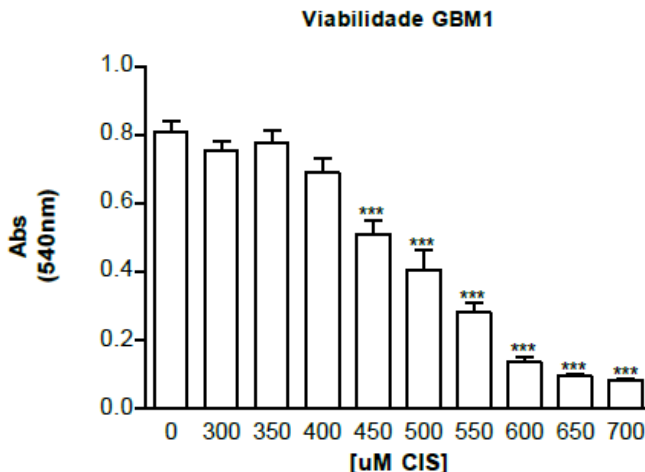


Figura 3: Viabilidade celular do GBM1 por teste de viabilidade celular (MTT). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após a confluência foram tratadas com CIS (cisplatina), em uma curva de concentração de 300 a 700  $\mu$ M, por 24 horas. A viabilidade celular é proporcional à absorbância obtida. Os dados são expressos com suas médias  $\pm$  SEM e em relação ao controle (CT), sendo resultados de três experimentos independentes, realizados em quadruplicatas.

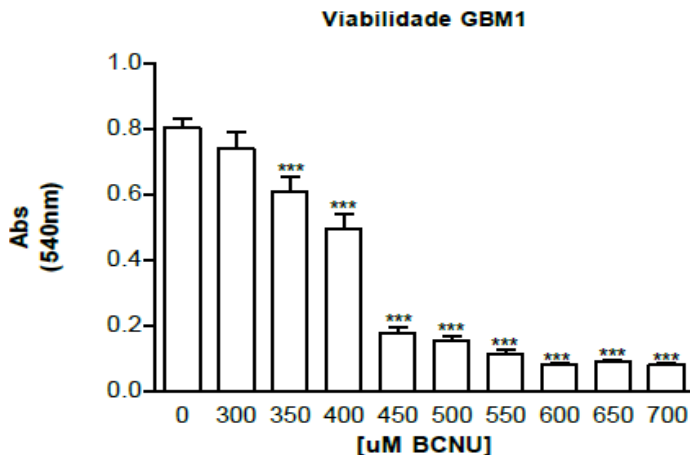
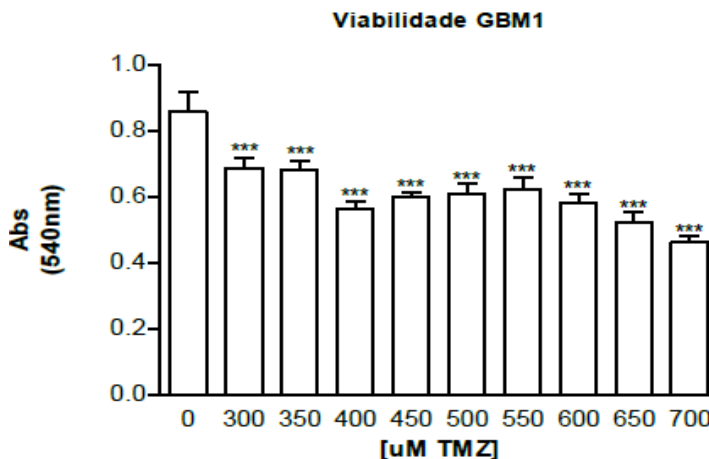


Figura 4: Viabilidade celular do GBM1 por teste de viabilidade celular (MTT). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após a confluência foram tratadas com BCNU (carmustina), em uma curva de concentração de 300 a 700  $\mu$ M, por 24 horas. A viabilidade celular é proporcional à absorbância obtida. Os dados são expressos com suas médias  $\pm$  SEM e em relação ao controle (CT), sendo resultados de três experimentos independentes, realizados em quadruplicatas.

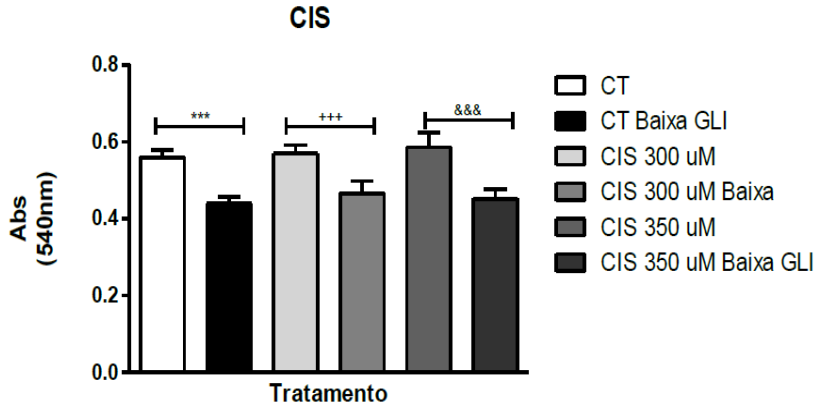




**Figura 5: Viabilidade celular do GBM1 por teste de viabilidade celular (MTT).** As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após a confluência foram tratadas com TMZ (temozolomida), em uma curva de concentração de 300 a 700 µM, por 24 horas. A viabilidade celular é proporcional à absorbância obtida. Os dados são expressos com suas médias  $\pm$  SEM e em relação ao controle (CT), sendo resultados de três experimentos independentes, realizados em quadruplicatas.

## **4.2 - Viabilidade celular do glioblastoma após tratamento com CIS, BCNU e TMZ em meio de cultura com restrição de glicose**

Para verificar se a retirada da glicose do meio de cultura poderia otimizar o efeito dos quimioterápicos na viabilidade das células de GBM, realizamos o cultivo destas células em meio de cultura de baixa glicose ou com concentração normal de glicose por 48 horas, seguido do tratamento com CIS, BCNU e TMZ por mais 24 horas. Conforme as figuras 6, 7 e 8, observamos que a restrição de glicose por si só causa uma queda significativa na viabilidade das células. Entretanto, a adição de nenhum dos quimioterápicos promoveu maior morte celular, já que a diminuição da viabilidade celular é idêntica à promovida pela retirada da glicose para todas as drogas em todos os pontos, sugerindo que o mecanismo de ação dos quimioterápicos é independente da quantidade de glicose no meio de cultura.



**Figura 6:** Viabilidade celular do GBM1, por teste de viabilidade celular (MTT), após cultivo em meio de cultura com baixa glicose (Baixa GLI) e tratamento com Cisplatina (CIS). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, mantidas em meio de baixa glicose ou com concentração usual de glicose por 48 horas e após este período tratadas com 300 e 350  $\mu$ M de CIS por 24 horas em DMEM F12. Foi realizado o ensaio de MTT, o qual é determinado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular é proporcional à absorbância obtida. Os dados são expressos com suas médias  $\pm$  SEM e em relação ao controle (CT), sendo resultados de três experimentos independentes, realizados em octoplicatas.

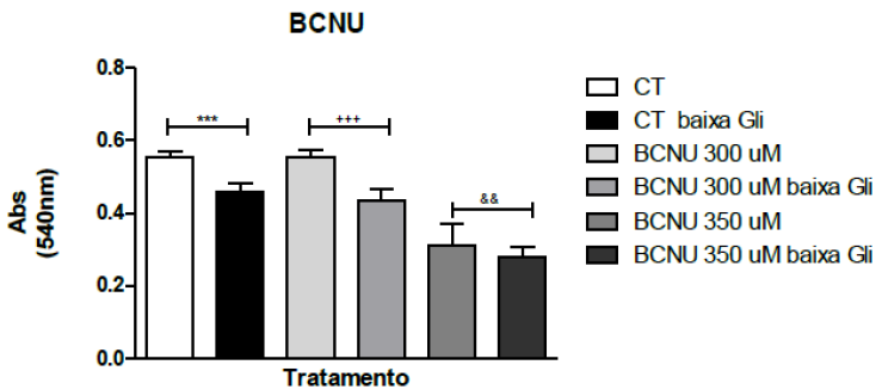


Figura 7: Viabilidade celular do GBM1, por teste de viabilidade celular (MTT), após cultivo em meio de cultura com baixa glicose (Baixa GLI) e tratamento com carmustina (BCNU). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, mantidas em meio de baixa glicose ou com concentração usual de glicose por 48 horas e após este período tratadas com 300 e 350  $\mu$ M de BCNU por 24 horas em DMEM F12. Foi realizado o ensaio de MTT, o qual é determinado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular é proporcional à absorbância obtida. Os dados são expressos com suas médias  $\pm$  SEM e em relação ao controle (CT), sendo resultados de três experimentos independentes, realizados em octoplicatas.

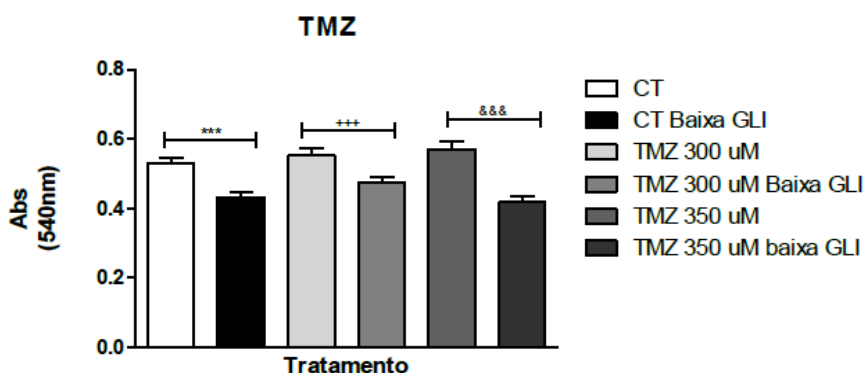


Figura 8: Viabilidade celular do GBM1, por teste de viabilidade celular (MTT), após cultivo em meio de cultura com baixa glicose (Baixa GLI) e tratamento com temozolomida (TMZ). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, mantidas em meio de baixa glicose ou com concentração usual de glicose por 48 horas e após este período tratadas com 300 e 350  $\mu$ M de BCNU por 24 horas em DMEM F12. Foi realizado o ensaio de MTT, o qual é determinado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular é proporcional à absorbância obtida. Os dados são expressos com suas médias  $\pm$  SEM e em relação ao controle (CT), sendo resultados de três experimentos independentes, realizados em octoplicatas.



## 5 – DISCUSSÃO

O estudo das características metabólicas das células tumorais é foco de pesquisas que tem como principal objetivo a busca por tratamentos alternativos e menos tóxicos para o organismo. Diferentes propostas de ensaios e técnicas para avaliação do efeito da restrição de glicose tem sido utilizadas, em exemplo de XU e colaboradores (2005), em que foram utilizadas células de linhagens de leucemia humana para medição de parâmetros bioquímicos envolvidos na atividade glicolítica *in vitro*, e o estudo de SAFDIE e colaboradores (2012), com análise *in vivo* do papel da privação calórica no crescimento de tumores em ratos. As figuras 3, 4 e 5 mostram o resultado do teste de viabilidade (MTT) realizados independentemente com diferentes concentrações dos quimioterápicos analisados, cisplatina, carmustina e temozolomida. Os três quimioterápicos tem sua ação principal, em termos de citotoxicidade, dependente da alquilação do DNA de maneiras diferentes, o que consequentemente deve influenciar no grau de toxicidade para as células de glioblastomas. Como dito anteriormente, apesar de o mecanismo de ação da carmustina ser parecido ao mecanismo de ação da temozolomida e cisplatina, esta demonstrou ter uma maior citotoxicidade perante tratamento das células GBM1, sua ação sobre a viabilidade foi mais visível. Observou-se que em concentrações menores, provocando morte em mais de 75% das células, na concentração de 400  $\mu\text{M}$ . Nessa mesma concentração, a cisplatina alterou a viabilidade de menos de 15% das células em cultura, e a temozolomida provocou morte em aproximadamente 35% das células. Estudos anteriores de curvas de concentração com cisplatina e cultura de linhagens A172 confirmam que a ação deste quimioterápico é efetiva em concentrações acima de 300  $\mu\text{M}$  (DE OLIVEIRA, 2013).

A cisplatina geralmente é utilizada como terapia adjuvante, juntamente ao uso de outro quimioterápico ou radioterapia, para intensificar a ação antitumoral, pois não tem grande capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (CARRILLO et al., 2012). Os resultados da curva de concentração do tratamento com cisplatina mostram que, *in vitro*, este quimioterápico tem ação mais acentuada a partir da concentração de 500 a 550  $\mu\text{M}$ , diminuindo a viabilidade celular das culturas de GBM para cerca de 50% nessas concentrações. Já a temozolomida foi a droga que demonstrou ter o menor potencial citotóxico; mesmo em concentrações altas, a temozolomida alcançou menos de 50% de morte celular na concentração de 700  $\mu\text{M}$ , enquanto

carmustina e cisplatina agiram em quase 90% das células em cultura, provocando morte celular, nesta mesma concentração. Estudos mostram que a temozolomida tem sido o quimioterápico de tratamento mais escolhido em casos de glioblastomas, concomitante com a radioterapia, por ser um medicamento de melhor aceitação e apresentar diminuição das reações adversas pelo uso, em comparação com outros quimioterápicos (FLORIO et al, 2012). Relacionando esta informação com a ação do TMZ nas culturas de GBM1, provavelmente este quimioterápico é menos tóxico para as células do organismo em geral, assim como também é menos ativo nas células tumorais, portanto os sintomas do tratamento são mais tolerantes. Estudos comparando o uso de BCNU e TMZ juntamente a radioterapia mostram que os pacientes tratados com temozolomida sobreviveram por mais tempo em comparação com os tratados com carmustina, mostrando que maior citotoxicidade não está necessariamente ligada ao aumento da sobrevivência no tratamento de glioblastomas, apesar de que em culturas *in vitro* a carmustina é nitidamente mais eficiente nas culturas de células tumorais, em termos de viabilidade celular. São necessários mais dados científicos para analisar e comparar a ação destes quimioterápicos (CARRILLO et al., 2012).

A análise das Figuras 6, 7 e 8 possibilita inferir, em primeira mão, que nos tratamentos com os três diferentes quimioterápicos, a restrição de glicose possui papel na diminuição da viabilidade celular, atuando de maneira independente à ação das drogas. A diminuição da glicose do meio de cultura celular pelo tempo determinado de 48 horas diminuiu a viabilidade de aproximadamente 50% das células de GBM1. A adição das drogas para análise dos tratamentos foi feita com meio de cultura DMEM F12, que possui glicose considerada ideal/normal para manter a sobrevivência celular, portanto, não foi possível analisar o efeito da restrição de glicose concomitante a ação alquilante dos quimioterápicos. Teoricamente, a diminuição da energia proveniente da quebra da glicose é capaz de sensibilizar as células tumorais, pelo motivo destas células não terem mecanismos neuroprotetores eficientes para esta situação especial (KLEMENT et al., 2011). Estudos que abrangem metabolismo da glicose em células tumorais mostram que na maioria das células cancerosas as mitocôndrias são disfuncionais, contribuindo muitas vezes para que ocorram mutações no DNA celular, pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários do ciclo de Krebs livres, capazes de interagir com as moléculas eletricamente ativas naturais das células,

como as bases nitrogenadas (GRANDEMANGE et al., 2009 e PELICANO et al., 2006). Esta produção acentuada de ROS está relacionada com o aumento da tumorigênese, que está caracterizada pela imortalidade celular e subsequente transformação maligna do tumor. A “glicólise aeróbica”, ou efeito Warburg, é protagonista de vários estudos que abrangem o metabolismo da glicose em células tumorais. Esse fenômeno consiste na tendência que as células tumorais possuem em quebrar a glicose em lactato para obter energia, mesmo na presença de oxigênio. Especula-se que o efeito Warburg pode ser consequência de mutações que afetam o DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) ou em genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, pela ativação de genes relacionados com adaptações aos microambientes anormais, no caso, quando ocorre hipóxia (KIM, et al, 2006, SEYFRIED et al, 2010 e MATHEWS et al., 2011).

Os resultados dos experimentos com meio de baixa glicose e tratamento com os fármacos alquilantes apontam, em quase todos, que a restrição de glicose foi a principal atuante na morte celular observada nos gráficos. Devido à concentração escolhida para os tratamentos, não foi possível observar grandes interferências provocadas pela ação dos quimioterápicos. Com 300 e 350  $\mu\text{M}$ , a temozolomida e a cisplatina alteraram a viabilidade de forma sutil e pouco significativa, sendo que a carmustina mostrou maior citotoxicidade nestas concentrações. A escolha destas concentrações deveu-se ao objetivo de observar se a fragilidade causada pela restrição de glicose poderia aumentar a morte celular após o tratamento com as drogas. Os resultados mostram que as concentrações escolhidas não foram suficientes para determinar uma ação significativa da droga na viabilidade celular, com exceção da carmustina, que mostrou interferir nas células na concentração de 350  $\mu\text{M}$ , novamente apontando a possibilidade de esta droga ser mais tóxica para as células em menor concentração.

Relacionando as informações literárias referentes ao metabolismo da glicose diferencial das células cancerosas, é possível entender porque elas são mais susceptíveis às alterações de concentração de glicose no meio de cultura, e a ação da retirada de glicose é imediata e facilmente observada. Em um organismo em seu contexto metabólico comum, a diminuição de glicose livre não necessariamente afetaria as células normais, pois os mamíferos possuem outras vias de obtenção de energia independente da quebra da glicose. Especialmente as células cerebrais utilizam a glicose como fonte energética principal, e os cetônatos são utilizados como alternativa em casos de restrição de

carboidratos (SEYFRIED et al., 2011). Se torna necessário e ideal um ensaio de comparação entre a viabilidade celular de culturas de glioblastomas e culturas de células cerebrais normais sob restrição de glicose, a fim de perceber a interferência da função mitocondrial nos dois tipos de células.

Pode-se considerar que os estudos dos efeitos da privação de glicose em células tumorais necessitam de ensaios variados para se ter dados concretos de como essa restrição influencia o ciclo celular e de que maneira pode ser adaptada aos tratamentos *in vivo*. As perspectivas futuras para aprofundar estes estudos são os ensaios bioquímicos, por exemplo, análise de ROS intracelular por citometria de fluxo, ensaios que abranjam bioenergética em células tumorais, técnicas moleculares com ênfase em marcadores para metabolismo energético como o oncogene MYC, que está altamente ativado em células cancerosas e tem ação na ativação do efeito Warburg, o supressor de tumores p53, que frequentemente está mutado em cânceres humanos, e também estimula a respiração mitocondrial, entre vários outros marcadores de metabolismo conhecidos atualmente. Também seria interessante observar a inibição da glicólise e a ação dessa inibição na resistência dos tumores aos quimioterápicos (HEIDEN et al., 2009).



## 6 - CONCLUSÕES

A possibilidade de intervenção através de um tratamento metabólico e com baixa toxicidade para o organismo em geral é uma ideia promissora, e vem demonstrado avanços e bons resultados em estudos atuais. Novos dados obtidos com o uso de diferentes técnicas experimentais são necessários e essenciais para completar este estudo. Referente às conclusões deste trabalho, é possível afirmar que:

- Os três quimioterápicos mais comumente utilizados no tratamento de tumores sólidos, mesmo sendo ambos alquilantes do DNA como princípio ativo, possuem ação variável na viabilidade celular em termos de citotoxicidade, sendo que cada uma das drogas interfere na viabilidade celular de maneiras diferentes, dependendo da concentração determinada no tratamento.
- A retirada da glicose nos meios de cultura com células de GBM1 provoca diminuição da viabilidade celular por mecanismos não identificados, que podem estar relacionados aos mecanismos de apoptose e necrose celular.
- BCNU teve sinergia de efeito na viabilidade celular com a restrição de glicose na concentração de 350  $\mu$ M.
- TMZ e CIS não apresentaram efeito na viabilidade nos ensaios de restrição.
- Os dados experimentais obtidos podem ser ocorrências específicas da cultura de células utilizada, sendo necessário estudos mais aprofundados e comparativos para análise do real efeito dos quimioterápicos e da restrição de glicose em células tumorais e, também, em células não cancerosas (células normais).



## 7 - ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** CARACTERIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS A PARTIR DE GLIOMAS PROVENIENTES DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE RESSEÇÃO NO HOSPITAL GOVERNADOR CELSO RAMOS, FLORIANÓPOLIS, SC

**Área Temática:**

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

**Versão:** 1

**CAAE:** 04087112.9.0000.0121

**Pesquisador:** Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

**Instituição:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (Hospital Universitário HU- UFSC)

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 108.286

**Data da Relatoria:** 24/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

O estudo de Aguiar pretende estudar culturas de células de gliomas ressecados de pacientes do Hospital Celso Ramos, Florianópolis.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estabelecer linhagens tumorais primárias a partir de gliomas humanos provenientes de pacientes submetidos à ressecção de tumores no Hospital Celso Ramos, Florianópolis, SC, estudando nestas linhagens os efeitos do tratamento com temozolamida e carmustina na modulação do aminoácido excitatório glutamato e o perfil de células tronco presentes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos suplantam os benefícios.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Contribuirá sobre o conhecimento generalizável sobre o tema.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCE adequado, anuência do HGCR.

**Recomendações:**

Não se aplica

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pela aprovação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

FLORIANOPOLIS, 26 de Setembro de 2012

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza

## 8 - REFERÊNCIAS

- CARRILLO, J. A.; MUNOZ, C. A. (2012) Alternative Chemotherapeutic Agents: Nitrosoureas, Cisplatin, Irinotecan. *Neurosurg Clin N Am* 23:297–306.
- DE OLIVEIRA, K. A. (2013) Avaliação do quimioterápico cisplatina na modulação do sistema glutamatérgico na linhagem de glioma humano A172 e em astrócitos corticais de ratos neonatos. 72 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Programa de Pós Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2013.
- DEIMLING, A. V.; SCHLAG, P. M.; SENN, H. J. (2009) Gliomas. *Recent Results in Cancer Research* 171:3-21, 125-173.
- DIAZ-RUIZ, R.; URIBE-CARVAJAL, S.; DEVIN, A.; RIGOLET, M. (2009) Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 179:6252–265.
- FLORIO, T.; BARBIERI, F. (2012) The status of the art of human malignant glioma management: the promising role of targeting tumor-initiating cells. *Drug Discovery Today* 17(19/20)1103-1110.
- GERSON SL. (2002) .Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol.* 20(9):2388-99.
- GRANDEMANGE, S.; HERZIG, S.; MARTINOU, J. (2009) Mitochondrial dynamics and cancer. *Seminars in Cancer Biology* 19:50–56.
- HEIDEN, M. G. V.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. (2009) Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324:1029-1033.
- KIM, J.; DANG, C. V. (2006) Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Res.* 66:8927-8930.

KLEMENT, R. J.; KÄMMERER, U. (2011) Is there a role for carbohydrate restriction in the treatment and prevention of cancer? *Nutrition & Metabolism* 8:75-90.

LIN, C.; LEE, C.; SHIH, Y.; LIN, C.; WANG, S., CHEN, T.; SHIS, C. (2012) Inhibition of mitochondria – and endoplasmatic reticulum stress-mediated autophagy augments temozolamide-induced apoptosis in glioma cells. *Plos One* 7(6):e38706.

MAGISTRETTI, P. J. (2004) Brain Energy Metabolism. *From Molecules to Network: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience* (3):67–89.

MATHEWS, E. H.; PELZER, R.; LIEBENBERG, L. (2011) High-glycolytic cancers and their interplay with the body's glucose demand and supply cycle. *Medical Hypotheses* 76:157–165.

MI AN, J.; SEON SOOK KIM, S. S.; JIN HAK RHIE, J. H.; SHIN, D. M.; SEO, S. R.; TAEG SEO, J. (2011) Carmustine induces ERK- and JNK-dependent cell death of neuronally-differentiated PC12 cells via generation of reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro* 25:1359–1365.

OTTO, S. E. (2002) Oncologia. *Reichmann & Affonso Editores*. Rio de Janeiro, RJ.

PAPAIT, R.; MAGRASSI, L.; RIGAMONTI, D.; CATTANEO, E. (2009) Temozolomide and carmustine cause large-scale heterochromatin reorganization in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379:434–439.

PELICANO, H.; MARTIN, D. S.; XU, R. H.; HUANG, P. (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25:4633–4646.

REIFENBERGER, G.; BLÜMCKE, I.; PIETSCH, T.; PAULUS, W. (2010) Pathology and Classification of Tumors of the Nervous System. *Oncology of CNS Tumors*

SANCHO-MARTÍNEZ, S. M.; PRIETO-GARCÍA, L.; PRIETO, M.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; LÓPEZ HERNÁNDEZ, F. J. (2012)

Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. *Pharmacology & Therapeutics* 136:35–55.

SAFDIE, F.; BRANDHORST, S.; WEI, M.; WANG, W.; LEE, C.; HWANG, S.; CONTI, P. S.; CHEN, T. C.; LONGO, V. D. (2012) Fasting Enhances the Response of Glioma to Chemo- and Radiotherapy. *PLOS ONE* 7(9):44603.

SEYFRIED, T. N.; MARSH, J.; SHELTON, L. M.; HUYSENTRUYT, L. C.; MUKHERJEE, P. (2012) Is the restricted ketogenic diet a viable alternative to the standard of care for managing malignant brain cancer? *Epilepsy Research* 100:310-326.

SEYFRIED, T. N.; SHELTON, L. M. (2010) Cancer as a metabolic disease. *Seyfried and Shelton Nutrition & Metabolism* 7:7.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 4:307-320 .

XU, R.; PELICANO, H.; ZHOU, Y.; CAREW, J. S.; FENG, L.; BHALL A, K. N.; KEATING, M. J.; HUANG, P. (2005) Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *Cancer Res* 65: (2)613-621.